Parque Científico • Universidad de Valencia • C/Catedrático Agustín Escardino 9
46980 Paterna (Valencia) • Tel. 96 321 23 40 • Fax: 96 321 23 41 • www.imegen.es

instituto de medicina genómica
imegen

IMG-116

imegen® – Quimera

Cuantificación de polimorfismos en quimeras hematopoyéticas mediante PCR a tiempo real

Inscrita en el Registro Mercantil de Valencia, Tomo 9066, Libro 6350, Folio 80, Hoja nº V-134945, Insc. 1ª C.I.F. B98165723

1. Descripción

La cuantificación relativa mediante PCR a tiempo real de polimorfismos de inserción/deleción permite determinar la presencia de quimerismos hematopoyéticos en el periodo post-trasplante.

El set **imegen®-Quimera** contiene los oligonucleótidos necesarios para cuantificar polimorfismos de inserción/deleción o alelos nulos respecto a la cantidad total de ADN presente en la muestra.

2. Componentes y almacenamiento del set

Este set contiene reactivos suficientes para la realización de 50 reacciones.

REACTIVOS	Viales	Conservación	Rehidratación
Máster-Polimorfismo	25 reacciones	4ºC	80 µl de agua/vial*
Máster-β-globina	25 reacciones	4ºC	80 µl de agua/vial*

*Después de la rehidratación mantener los reactivos a -20ºC

3. Procedimiento de análisis

La cuantificación relativa, mediante PCR a tiempo real, de polimorfismos de inserción/deleción permite determinar la presencia de quimerismos hematopoyéticos en el periodo post-trasplante. Para realizar dicha cuantificación es necesario analizar un gen de referencia (β-globina) y un polimorfismo informativo. Se considera que un polimorfismo es informativo cuando se detecta en el receptor del trasplante y no en el donante. Para determinar la informatividad de los polimorfismos se han desarrollado los sets **imegen®-Quimera Screening**.

El diseño de todos los ensayos incluirá los controles negativos adecuados así como un calibrador. El Instituto de Medicina Genómica le recomienda emplear como calibrador el ADN del receptor antes del trasplante.

4. Preparación de las reacciones de amplificación

1. Descongelar el Máster-Polimorfismo, el Máster-β-globina y el ADN de las muestras. Dar un vórtex a cada uno de los reactivos y mantener en frío.
2. En un tubo de 1,5 ml añadir las cantidades necesarias para todas las reacciones del gen β-globina. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una reacción mas, o bien calcular y añadir un 10% más de cada uno de los reactivos.
3. En un tubo de 1,5 ml añadir las cantidades necesarias para todas las reacciones del polimorfismo. Se recomienda realizar los cálculos añadiendo reactivos suficientes para analizar una reacción mas, o bien calcular y añadir un 10% más de cada uno de los reactivos.

REACTIVOS	Volumen por reacción
Máster-β-globina o polimorfismo	3 µl
Máster-Mix PCR 2x	5 µl

4. Mezclar los Mix de PCR y pipetear 8 µl en los pocillos de PCR correspondientes.
5. Añadir 2 µl de ADN (50 ng/µl) a cada una de las reacciones.

5. Amplificación

Someter las reacciones de amplificación al siguiente programa de amplificación:

Programs							
Program Name					Cycles	Analysis Mode	
Desnaturalizacion					1	None	
Amplificacion					50	Quantification	
Frio					1	None	
Desnaturalizacion Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:10:00	4.4		0	0	0
Amplificacion Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
95	None	00:00:05	4.4		0	0	0
58	None	00:00:10	2.2		0	0	0
72	Single	00:00:15	4.4		0	0	0
Frio Temperature Targets							
Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisitions (per °C)	Sec Target (°C)	Step Size (°C)	Step Delay (cycles)
40	None	00:00:20	2.2		0	0	0

*Estas condiciones han sido ensayadas en un termociclador LightCycler 480

6. Análisis de los resultados

1. Comprobar que en los controles negativos no hay amplificación. En caso de detectarse amplificación se recomienda repetir el análisis para descartar que se haya producido una contaminación accidental.
2. Comprobar que el gen de referencia (β-globina) se detecta en un ciclo de PCR no superior a 26. Amplificaciones superiores a este Ct indican que la cantidad de ADN en la muestra no es suficiente lo que producirá una disminución de la sensibilidad del análisis.
3. Para realizar la cuantificación relativa de la quimera hematopoyética se ha desarrollado un software específico disponible en www.imegen.es/Quimera. Este software le permitirá obtener el resultado una vez que introduzca los siguientes parámetros:
    a. Seleccionar el polimorfismo empleado en el análisis
    b. Indicar los Ct del calibrador (muestra del receptor antes del trasplante), tanto para la β-globina como para el polimorfismo empleado
    c. Indicar los Ct de las muestras, tanto para la b-globina como para el polimorfismo empleado

7. Control de calidad

Todos los productos comercializados por el Instituto de Medicina Genómica son sometidos a un riguroso control de calidad. El set **imegen®-Quimera** ha superado todas las pruebas de validación internas, que garantizan la fiabilidad y reproducibilidad de cada ensayo.

8. Garantías y responsabilidades

El Instituto de Medicina Genómica le garantiza que todos sus productos están libres de defectos, tanto en los materiales empleados como en su proceso de su fabricación. Esta garantía se hace extensible a un período de un año desde la fecha de envío del producto, siempre que se observen las condiciones de conservación especificadas en este Manual. **Nuestros productos están diseñados para uso en investigación**. El usuario de los productos es responsable de validar la utilidad de los protocolo propuestos por el Instituto de Medicina Genómica. Dichos protocolos se consideran únicamente una guía. El Instituto de Medicina Genómica no le ofrece ninguna otra garantía, expresa o implícita, que se extienda más allá del funcionamiento correcto de los componentes de este set. La única obligación del Instituto de Medicina Genómica, respecto de las garantías precedentes, será la de reemplazar los productos, o bien devolver el precio de la compra de los mismos, a voluntad del cliente, siempre y cuando se pruebe la existencia de un defecto en los materiales, o bien en la elaboración de sus productos. El Instituto de Medicina Genómica no será responsable de ningún daño, directo o indirecto, que resulte en pérdidas económicas o en daños que pudieran producirse por el uso de este producto por parte del comprador o usuario.

9. Servicio de atención al cliente

Para cualquier consulta sobre las aplicaciones de este producto o sobre sus protocolos, puede contactar con nuestro Departamento Técnico:

Teléfono: 963 212 340
Mail: info@imegen.es

Inscrita en el Registro Mercantil de Valencia, Tomo 9066, Libro 6350, Folio 80, Hoja nº V-134945, Insc. 1ª C.I.F. B98165723